



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1747号
学位記番号	第1244号
氏名	今藤 裕之
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	Acquisition of gemcitabine resistance enhances angiogenesis via upregulation of IL-8 production in pancreatic cancer (膵癌のゲムシタビン耐性化は IL-8 産生亢進を介して血管新生を促進する)  Oncology reports, 41: 3508-3516, 2019
論文審査担当者	主査： 片岡 洋望

## 論文内容の要旨

【目的】 ゲムシタビン(Gem)は膵癌の化学療法に広く使用されているが、その効果は十分に満足いくものではない。その原因として膵癌の Gem に対する耐性化が挙げられるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。一方近年、癌の増殖、浸潤、転移にケモカインが重要な役割を果たしていることが報告されている。IL-8 は白血球や様々な癌細胞より産生されるケモカインであり、癌の浸潤、血管新生、転移に関与していることが明らかとなっている。当教室ではこれまでに、膵癌由来の IL-8 が腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしており、IL-8 の受容体である CXCR2 を阻害することで膵癌の血管新生および腫瘍形成が抑制されることを報告してきた。今回我々は、膵癌細胞株の Gem 耐性化に伴う IL-8 発現の変化を検討し、耐性化に伴う血管新生能の変化と抗 CXCR2 抗体の効果を検討することを目的とした。【方法】膵癌細胞株 MIA PaCa-2 および AsPC-1 を用いて Gem 耐性膵癌細胞株を樹立した。(1)耐性株と感受性株の Gem 投与下での細胞増殖能を WST-1 assay で検討した。(2)耐性株と感受性株の Gem 非投与下での細胞増殖能を検討した。(3)Gem 耐性株と感受性株を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行い、Gem 耐性化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的に比較検討した。(4)マイクロアレイ解析において耐性株で発現亢進が認められた遺伝子の中から IL-8 に着目し、耐性株と感受性株の IL-8 mRNA 発現の変化を qRT-PCR で検討した。(5)耐性株と感受性株の培養上清を用いてサイトカインアレイおよび IL-8 ELISA を行い、IL-8 産生の変化を検討した。(6)線維芽細胞および血管内皮細胞を癌細胞と共培養することで血管内皮細胞の管腔形成能を定量的に評価する血管新生実験を行い、耐性株と感受性株による血管新生能の変化を検討した。また、抗 CXCR2 抗体による血管新生抑制効果を検討した。【結果】(1)WST-1 assay により、MIA PaCa-2 および AsPC-1 の 2 細胞株で Gem 耐性化を確認した。(2)耐性株と感受性株の Gem 非投与下での細胞増殖能に変化を認めなかった。(3)MIA PaCa-2 の耐性株と感受性株で 54675 遺伝子の発現変化を検討した。mRNA 発現が 2 倍以上に亢進していた遺伝子数は 1205、1/2 以下に低下していた遺伝子数は 3157 であった。(4) MIA PaCa-2、AsPC-1 双方で、耐性株の IL-8 mRNA 発現亢進を認めた。(5) MIA PaCa-2、AsPC-1 双方で、耐性株の IL-8 産生亢進を認めた。(6)膵癌細胞株と共培養を行うことで血管内皮細胞の管腔形成能は有意に亢進した。MIA PaCa-2、AsPC-1 双方で、耐性株との共培養が感受性株との共培養と比較して有意に血管新生能を亢進した。また、亢進した血管新生能は抗 CXCR2 抗体を用いることで有意に抑制された。【結論】膵癌細胞株の Gem 耐性化に伴い IL-8 の発現が亢進した。耐性株は感受性株と比較して血管新生能を有意に亢進させ、これは抗 CXCR2 抗体を用いることで有意に抑制された。これらの結果から、Gem に耐性化した膵癌において IL-8/CXCR2 シグナルが血管新生に重要な役割を果たしていると考えられ、このシグナルをターゲットとした新規治療の可能性が示唆された。

(注) 和文で 2, 000 字以内でまとめる

## 論文審査の結果の要旨

【目的】 ゲムシタビン(Gem)は膵癌の化学療法に広く使用されているが、その効果は十分に満足いくものではない。その原因として膵癌の Gem に対する耐性化が挙げられる。IL-8 は白血球や様々な癌細胞より産生されるケモカインであり、癌の浸潤、血管新生、転移に関与していることが明らかとなってきた。今回我々は、膵癌細胞株の Gem 耐性化に伴う IL-8 発現の変化を検討し、耐性化における腫瘍血管新生能の変化と抗 CXCR2 抗体の効果を検討することを目的とした。

【方法】 (1)膵癌細胞株 MIA PaCa-2 および AsPC-1 を用いて Gem 耐性膵癌細胞株を樹立した。(2)耐性株と感受性株の Gem 非投与下での細胞増殖能を検討した。(3)耐性株と感受性株を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行い、Gem 耐性化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的に比較検討した。(4)耐性株で発現亢進が認められた遺伝子の中から IL-8 に着目し、耐性株と感受性株の IL-8 mRNA 発現の変化を qRT-PCR で検討した。(5)耐性株と感受性株の培養上清を用いてサイトカインアレイおよび IL-8 ELISA を行い、IL-8 産生の変化を検討した。(6)血管新生実験を行い、耐性株と感受性株による血管新生能の変化を検討した。また、抗 CXCR2 抗体による血管新生抑制効果を検討した。

【結果】 (1) 2 細胞株で Gem 耐性化を確認した。(2)耐性株と感受性株の Gem 非投与下での細胞増殖能に変化を認めなかった。(3)耐性株と感受性株で mRNA 発現を比較検討し、発現が 2 倍以上に亢進した遺伝子数は 1205、1/2 以下に低下した遺伝子数は 3157 であった。(4)耐性株における IL-8 mRNA の発現亢進を認めた。(5)耐性株のタンパクレベルでの IL-8 産生亢進を認めた。(6)膵癌細胞株と共培養を行うことで血管内皮細胞の管腔形成能は有意に亢進した。耐性株との共培養が感受性株との共培養と比較して有意に血管新生能を亢進した。また、亢進した血管新生能は抗 CXCR2 抗体を用いることで有意に抑制された。

【結論】 膵癌細胞株の Gem 耐性化に伴い IL-8 の発現が亢進した。耐性株は感受性株と比較して血管新生能を有意に亢進させ、これは抗 CXCR2 抗体を用いることで有意に抑制された。これらの結果から、Gem に耐性化した膵癌において IL-8/CXCR2 シグナルが血管新生に重要な役割を果たしていると考えられ、このシグナルをターゲットとした新規治療薬の可能性が示唆された。

【審査内容】 主査の片岡教授からは、①Gem 耐性化メカニズムのメインは何か、②cDNA マイクロアレイで他に変化のみられた遺伝子は何か、③実臨床で Gem が無効となった患者の血管新生に変化はみられるのか、④CXCR2 抗体を用いた臨床研究は行われているのか、⑤今後の膵癌治療に関する展望は、など計 9 項目の質問がなされた。第一副査の高橋教授より、①耐性株で浸潤能や遊走能には変化はみられるのか、②膵癌細胞自体に CXCR2 は発現しているのか、③膵癌組織で IL-8 や CXCR2 の免疫染色は行ったか、など計 8 項目の質問がなされた。第二副査稲垣教授からは、①IL-8 の発現亢進は耐性化の原因であるのか結果であるのか、②IL-8 を腫瘍マーカーとして用いることは有用であると考えるか、③膵癌が予後不良である原因は何か、など計 11 項目の質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが概ね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、Gem に耐性化した膵癌において IL-8/CXCR2 シグナルが血管新生に重要な役割を果たしていることを明らかとした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 片岡 洋望 副査 高橋 智 稲垣 宏